## No title available

Publication number: JP5244942 (A)	Also published as					
Publication date: 1993-09-24	☐ JP3048466 (B2)					
Inventor(s): KAJIYAMA NAOI	NAKANO EIICHI +					
Applicant(s): KIKKOMAN COR						
Classification:						
C12N1/21; C12N	C12M1/21; C12M15/09; C12M15/53; C12M9/02; C12R1/19; C12M1/21; C12M15/09; C12M15/53; C12M9/02; (IPC1- 7): C12M1/21; C12M15/53; C12M9/02; C12M9/02; C12R1/19					
- European:						
Application number: JP19920131057	920522					
Priority number(s): JP19910157117 19910627; JP19910317064 19911129						
	0.10021, 0.1001001100110011120					
Abstract of JP 5244942 (A)						
PURPOSE:To provide a new modified	ene useful					
for the production of a heat- stable fire						
CONSTITUTION: A heat-stable firefly In	iferase					
gene coding an amino acid sequence	rresponding					
to the amino acid sequence of a wild-ty	e firefly					
luciferase, luciferase of Luciola cruciat	the amino					
acid sequence of formula) or luciferase	f Luciola and and an analysis analysis and an analysis and an analysis and an analysis and an					
lateralis provided that the 217th amino						
sequence is substituted with a hydroph						
acid (preferably isoleucine, leucine or v						
luciferase gene is produced by site-spe						
converting the 217th amino acid of the						
sequence of the wild-type firefly lucifer						
hydrophobic amino acid residue by tre- reagent, irradiation with ultraviolet ray.						
	SHELLC VALUE OF THE PARTY					
engineering technique, protein enginee technique, etc.	ng code visition to number such					
iechnique, etc.	The first and the first of the second of the second of the second of					
	core company a service bounder					
	and the second s					
	CHARLES CONTRACT TO A CONTRACT OF STREET					
	and the second second second second					
	exercise contract con					
	Service and American Service S					
	TO THE PROPERTY AND ADDRESS OF					
	CONTRACTOR STATES					
	The second secon					
	The section of the se					
Data supplied	om the espacenet database — Worldwide					

## (19)日本国特許庁(JP)

# (12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

# 特開平5-244942

(43)公開日 平成5年(1993)9月24日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup> C 1 2 N 9/02	識別記号	庁内整理番号 7823-4B	F I	技術表示箇所
15/53	ZNA			
# C 1 2 N 1/21		7236-4B		
(C12N 9/02				
		8931-4B	C 1 2 N	15/ 00 A
			審查請求 未請求	さ 請求項の数7(全 19 頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特顯平4-131057		(71)出願人	000004477
				キッコーマン株式会社
(22)出願日	平成 4 年(1992) 5 月	22∃		千葉県野田市野田339番地
			(72)発明者	梶山 直樹
(31)優先権主張番号	特顧平3-157117			千葉県野田市野田339番地 キッコーマン
(32)優先日	平3(1991)6月27日			株式会社内
(33)優先権主張国	日本(JP)		(72)発明者	中野 衛一
(31)優先権主張番号	特顧平3-317064			千葉県野田市野田339番地 キッコーマン
(32)優先日	平 3 (1991)11月29日			株式会社内
(33)優先権主張国	日本(JP)		(74)代理人	弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54) 【発明の名称 】 耐熱性ホタルルシフェラーゼ、耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子、新規な組み換え体DNA、 及び耐熱性ホタルルシフェラーゼの製造法

(57)【要約】

【構成】 野生型ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列 において、217位のアミノ酸、又はゲンジボタル若しく はヘイケボタルのルシフェラーゼの217位と同等位置の アミノ酸が疎水性アミノ酸に変異されていることを特徴 とする耐熱性ホタルルシフェラーゼ、当該耐熱性ルシフ ェラーゼをコードする遺伝子、当該耐熱性ルシフェラー ゼをコードする遺伝子を組み込んだベクター、及び当該 ベクターを用いた耐熱性ホタルルシフェラーゼの製造方

【効果】 本発明耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子の 発現により得られる耐熱性ホタルルシフェラーゼは、A TP等の微量検定等において極めて有用である。また本 発明の耐熱性ホタルルシフェラーゼの製造方法により. 効率よく上記ルシフェラーゼを得ることが可能であり、 産業上極めて有用である。

#### 【特許請求の範囲】

【請求項1】 野生型ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、217位のアミノ酸、又はゲンジボタル若 しくはヘイケボタルのルシフェラーゼの217位と同等位 窓のアミノ酸が疎水性アミノ酸に変異されているアミノ 酸配列をコードする耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝

【請求項2】 野生型ホタルルシフェラーゼがヘイケボ タル若しくはゲンジボタルのルシフェラーゼである請求 項1記載の耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子。

【請求項3】 疎水性アミノ酸がイソロイシン、ロイシン、若しくはバリンである請求項1又は請求項2記載のホタルルシフェラーゼ遺伝子。

【請求項4】 請求項1又は請求項2記載の耐熱性ホタ ルルシフェラーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入したこ とを特徴とする組み換え体DNA。

【請求項5】 請求項4記載の組み換え体DNAを含 み、耐熱性ホタルルシフェラーゼ生産能を有するエッシ ェリシア属に属する微生物を培地に信養し、培養物より 耐熱性ホタルルシフェラーゼを採取することを特徴とす る耐熱性ホタルルシフェラーゼの緊高法。

【請求項6】 野生型ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、217位のアミノ酸、又はデンジボタル若しくはヘイケボタルのルシフェラーゼの217位と同等位置のアミノ酸が確水性アミノ酸に変異されていることを特徴とする耐熱性ホタルルシフェラーゼ。

【請求項7】 野生型ホタルルシフェラーゼがヘイケボ タル若しくはゲンジボタルのルシフェラーゼである請求 項6 記載の耐熱性ホタルルシフェラーゼ。 【発明の詳細で説明】

#### Locall

【産業上の利用分野】本発明は、耐熱性ホタルルシフェ ラーゼ、耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子、新規な組 み換え体DNA及び耐熱性ホタルルシフェラーゼの製造 法に関する

#### [00021

【従来の技術】ルシフェラーゼは、発光素であるルシフ ェリンの酸化を触媒して、これを発光させる発光酵素で ある。そして、ルシフェリンの発光の際にATP等の物 質を必要とする、ゲンジボケル、ヘイケボケル、アメリ カボタル等由来のホタルのルシフェラーゼは、当該性質 に基づいて、上記ATP等の微量定量に利用されてい

【0003】しかしながら、一般的にルシフェラーゼ は、熱に対して不安定なため、試薬として保存する際に 失活しやかいという欠点を有する。かかる欠点を克服す るための手段の一つとして、試薬に塩等を活加して、あ る程度ルシフェラーゼを安定に保存することは可能であ る。しかし、この場合にも、ルシフェラーゼの様による 反応酸素が遅起され勝ちであるという欠もが存在する。

#### [0004]

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明は、耐 熱性を有するホタルルシフェラーゼを開発することを主 たる課題とする。

#### [0005]

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題に ついて就意検討した結果、野生型ホタルルシフェラーゼ における特定のアミノ酸映風を破水性アミン酸映場に変 横することにより、上記課題を解決し得ることを見出し た。すなわち、本願は、以下の発明を提供するものであ った。

- (1) 野生型ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、217位のアミノ酸、又はゲンジボタル若しくはヘイケボタルのルシフェラーゼの217位と同等位置のアミノ酸が疎水性アミノ酸に変異されているアミノ酸配列をコードする超熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子。
- (2) 野生型ホタルルシフェラーゼがヘイケボタル若し くはゲンジボタルのルシフェラーゼである(1)記載の 耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子。
- (3)疎水性アミノ酸がイソロイシン、ロイシン、若しくはパリンである(1)又は(2)記載のホタルルシフェラーゼ遺伝子。
- (4)(1)又は(2)記載の耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする組み換え体DNA。
- (5) (4) 記載の組み換え体DNAを含み、耐熱性ホ タルルシフェラーゼ生産能を有するエッシェリシア属に 属する健生物を増地に培養し、培養物より耐熱性ホタル ルルシフェラーゼを採取することを特徴とする耐熱性ホタ ルルシフェラーゼの製造法。
- (6) 野生型ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列において、217位のアミノ酸、又はゲンジボタル若しくはヘ イケボタルのルシフェラーゼの217位と同等位置のアミノ酸が確水性アミノ酸に変異されていることを特徴とする新熱性ホタルルシフェラーゼ
- (7)野生型ホタルルシフェラーゼがヘイケボタル若しくはゲンジボタルのルシフェラーゼである(6)記載の 耐熱性ホタルルシフェラーゼ。
- 【0006】以下、本勢明とついて詳細に説明する。本 等明における遺伝子の改変による耐熱性ルシフェラーゼ が頻供される前様として、野生型のホタルの遺伝子及び その組み換え体DNAを調整することが必要である。野 生型ホタルの遺伝子等の種類は、提供で置きれる研禁 他ルシフェラーせ遺伝子の種類はたじて用いられる。そ して、ホタル由歩のものであれば、如何なもものでも用 いることが可能であり、例えば、ゲンジボタル、ヘイケ ボタル等由来のものを用いることが可能である。
- 【0007】これらの遺伝子等は、すでに公知の方法に 従って調製される。例えば、野生型ゲンジボタル遺伝子 及びその組み換え体DNAは、特開平1-510%6号公報に

記載の方法により調製することが可能である。本発明に おいて、「ゲンジボタル若しくはヘイケボタルのルシフ ェラーゼの217位と同等位置のアミノ酸」とは、確定し たルシフェラーゼのアミノ酸配列をゲンジボタル若しく はヘイケボタルのルシフェラーゼのアミノの振列を上較 した場合に、ゲンジボタル若しくはヘイケボタルのルシ フェラーゼの217位のアミノ酸に対応するアミノ酸を意 味するものできる。

【0008】具体的には、既観のアミノ酸の相同性の解析用ソフト、例えば、Micro Genici® (ベックマン社 製)により、名々のルシフェラーゼのアミノ酸配列とゲ ンジボタル若しくはヘイケボタルのアミノ酸配列の相同 性を比較することにより決定される。当該アミノ酸とし ては、例えば、スレオニン若しくはアラニンが挙げられ るが、これらに関定されるものではない。

【0009】さらに、本発明において、「疎水性アミノ 酸」としては、イソロイシン、ロイシン、バリン、メチ オニン、トリアトファン、フェニルアラニン、プロリ ン、システイン、又はアラニン等を挙げることができ る。そして、これらの中でも、イソロイシン、ロイシ ン、又はバリンは、疎水性値が高いという点で特に好ま しいものとして挙げることができる。

【0010】野生型ホタルルシフェラー七遺伝子の突異 処埋は、企図する変異形態に応じた通常公知の方法で行 ない得る、すなおち、野生型ホタルルシフェラーゼ遺伝 干あるいは当結遺伝子の組み込まれた相み様え体DNA と変異原となる薬剤とを接触・作用させる方法;紫外線 腹射法:遺伝子工学的手法、又は蛋白質工学的手法を駆 使する方法等を広く用いることができる。

【0011】上記案異処理に用いられる変異原となる素別としては、例えば、ヒドロキシルアミン、NースチルーN'ニニトローNニニトロソグアニジン(NTG)、亜面酸、患能酸、ヒドラジン、繊酸、5 一プロモウラシル等を挙げることができる。この接触・作用の諸条件は、用いる薬剤の種類等に応じ条件を採ることが可能であり、現実に所望の変異を野生型ホタルルシフェラーゼ遺伝子において窓起することができる限り特に限定されない。通常、好ましくはる・120分に温度下で10分間以上、好ましくは10~180分間接触・作用させることで、所望の変異を発起可能であり、

【0012】 継外線照解を行立う場合においても、上記の通り常法に従うことができる(現代化学、pr24~30、 の通り常法に従うことができる(現代化学、pr24~30、 1989年6月号)。蛋白質工学的手法を駆使する方法としては、一般的に、サイトースペシフィック ミュータジ エネシス (Site~Specific Mutagenesis)として知られる 手法を用いることができる。例えば、Kramer法 (Krame r, W. et al., Nucleic Acids Res, vol. 12, po9441~96 6 (1984): Kramer, W. et al., Methods Enzymol, v ol. 154, pp350~367 (1987): Bauer, C. E. et al., Ge ne, vol.37, pp73-81 (1985)). Eckstein法 (Taylor, J. W. et al., Nucleic Acids Res, vol.13, pp.8749-8 76d (1985). Taylor, J. W. et al., Nucleic Acids Res, vol.13, 8765-8785(1985): Nakamaye, K. L. et a I., Nucleic Acids Res, vol.14, pp.9679-9698 (198 (6)). Kunkelž (Kunkel. T. A. Proc. Natl. Acid. S ci. U.S.A., vol.82, pp488-492 (1985): Kunkel. T. A. et al., Methods Enzymol, vol.154, pp.367-382 (1

【0013】なお、上記遺伝子改変法の他に、有機合成 法又は酵素合成法により、直接所望の改変ホタルルシフ ェラーゼ遺伝子を合成し得ることはもちろんである。上 記方法により得られる所望のホタルルシフェラーゼ遺伝 子の塩基配列の決定・確認は、例えばマキサムーギルバ ートの化学修飾法 [Maxam-Gilbert, Meth.Enzym., vol. 65, pp.499-560(1980) ] やM13ファージを用いるジデ オキシヌクレオチド鎮終結法「Messing et.al., Gene. vol. 19., pp.269-276(1982)〕等により行ない得る。 【0014】上述の如くして得られた耐熱性ホタルルシ フェラーゼ遺伝子を 常法により バクテリオファー ジ、コスミド、又は原核細胞若しくは直核細胞の形質転 換に用いられるプラスミド等のベクターに組み込み、各 々のベクターに対応する宿主を常法により、形質転換・ 形質導入をすることができる。例えば、宿主として、エ ッシェリア屋に属する微生物。例えば大脳南(E.coli) JM101 (ATCC 33876)、大腸菌(E.coli) DH1 (ATCC 338 49) 、大腸菌 (E.coli) HB 101 (ATCC 33694) 等を選択 する場合には、ハナハン (Hana-han) の方法 [ディーエ ヌエイ・クローニング (DNA Cloning)、第1巻、第 109~135頁(1985)]等により形質転換するか、あるい は「モレキュラー・クローニング (Molecular Clonin g)、第256~268頁、コールド・スプリング・ハーバー・ ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory) (198) 2) 」記載の方法等により形質導入することにより形質 転換株あるいは形質導入株を得ることが可能である。 【0015】そして、上記菌株より耐熱性ホタルルシフ ェラーゼ生産能を有する菌株をスクリーニングすること により、耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子をベクター DNAに挿入した組み換え体DNAを含み、耐熱性ホタ

ェラーゼ生整能を有する菌株をスクリーニングすること
により、耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子をベクター
DNAに挿入した組み換え体DNAを含み、前熱性ホタ
ルルシフェラーゼ生産能を有するエッシェリシア域には
さる菌株を得ることができる。このようにして得られて
直株より純化された新規な組み換え体DNAを得るに
は、例えばビー・グーリー(P. Guerry)等の方法(ジェ
イ・バクテリオロジー(J. Bacter lol ogy) 第116巻、第10 6~1066頁(1973年)]、デ・ビー・クレウェル(D.
B. Clewell)の方法(ジェイ・バクテリオロジー(J. Bacter riol ogy) 第116巻、第20 より得ることができる。

【0016】そして、このようにして得られた組み換え 体DNAより耐熱性ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含有 するDNAを得るには、例えば、該アラスミドDNAに 制限酵素、例えばEvcoll 及びPst I を温度30~40℃、好ま しくは37℃程度で I ~20時間、好ましくは20時間程度作 用させて、反応終了液をアガロースゲル電気洗動法 (モ レキュラー・クローニング(Molecular Clioning)、第150 頁、コールド・スプリング ハーバー ラボラトリー (Id Spring Barbor Laboratory) (1982)記載で処理するこ とはより得ることができる。

【0017】上記のようにして得られた耐熱性ホタルル シフェラーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入した組み換 え体DNAを含み、耐熱性サタルシェッラーゼ生産能 を有するエッシェリシア属に属する歯株を用いて耐熱性 ホタルルシフェラーゼを生産するには、この間様を通常 の固体持奏法で培養してもよいが、可能な限り液体培養 法を採用して培養するのが始ましい。

【0018】また、上記樹株を培養する指他としては、 切えば酵母エキス、トリアトン、ペプトン、肉エキス、 コーンスティープリカーあるいは大豆若しくは小麦ふすまの浸出液等の1種以上の窒素源に、塩化ナトリウム、 リン酸料1カリウム、リン酸等2カリウム、硫酸学2条あ シウム、塩化ゲイネシウム、塩化第2鉄、硫酸等2鉄あ るいは硫酸マンガン等の無機塩類の1種以上を添加し、 更に必要により精質原料、ビタミン等を適宜添加したも のが用いた力な

【0019】をお、培地の初発。PHは、PHア〜9に調整するのが適当である。また精製は30~42で、好ましく は37で前後で4つ4時間、好ましくは6~8時間で、通 気撹拌深部培養、振遠培養、静置培養等により実施する のが好ましい、培養終了後、該培養物より耐熱性ホタル ルシフェラーゼを採取するには、通常の酵素採取手段を 用いて得ることができる。

【0020】例えば、常法により歯体を、超音波破壊処 腫、密幹処理などするか、または、リゾチーム等の溶菌 酵素を用いて希腊素を抽出するか、またはトルエン等の 存在下で振盪もしくは放置して自己消化を行わせ本酵素 を歯体外に排出させることができる。そして、この溶液 をが過、遠心分離などして固形部分を除去し、必要に りストレプトマイシン硫酸塩、プロタミン硫酸塩、硫酸 マンガン等により核酸を除去したのち、これに硫灰、ア ルコール、アセトン等を添加して分画し、洗燥物を採取 ・ 和産業を考しる。

【0021】上記租酵素よりさらに精製酵素配品を得る には、例えばセファデックス、ウルトロゲルもしくはバ イオゲル等を用いるゲルが設法:イオン交換体を用いる 吸着溶出法:ボリアクリルアミドゲル等を用いる電気洗 動法:トドロキシアパタイトを用いる吸着溶出法:蔗糖 密度均配速心法等の沈降法:アフィニティクロマト法: 分子ふるい概もしくは中空表膜等を用いる所書法等を適 宣選択し、またこれらを組合わせて実施することによ り、精製された酵素個品を得ることが出来る。 【0022】このようにして、所望の崩壊性ホタルルシ フェラーゼを得ることができる。そして。 タルルシフェラーゼは、以下に示す性質を除き、特別甲 1-14159号公報記載の呼性型ゲンジボタルのルシフェラ ーゼ、又は特別下1-26274号公報記載のヘイケボタルの ルシフェラーゼと同様である。

作用適温の範囲: 0~65℃である。

pH、温度等による失活の条件:

i ) pH4.0 以下又は pH12.0以上で4時間後完全に失 活する。

【0023】ii) pH7.8 において温度65℃、60分間の 熱処理により完全に失活する。

熱安定性:温度50°C、20分間の処理で80%以上の残存 酵素活性を有し、温度50°C、60分間の処理で6.65%以上 の残存酵素活性を有する。 【0024】

【実施例】以下、実施例を帰げて未発明を更に具体的に 説明する。なお、以下に述べる項目 1-10には、ホタル の1種であるフォティナス、ヒラリスのルシフェラーゼ をコードする遺伝子を含有するDNA(歳DNAは、ル ンオラ・クルシアタのルシフェラーゼをコードする遺伝 子を含有するDNAを検索する際、プローフとして使用

されるものである。) の調製について述べる。

m-RNAの調製

ホタルの1種であるフォティナス・ビラリス (Photinus pyralis) の乾燥電船(シゲマ社製)1 gを乳鉢及び乳棒 と声叫い充分破砕したものに、溶解緩衝液 5点 (2004) リスー塩酸緩崩液 (Ph.7 ル) 小 100 (2004) ショ機/1.2% (V/V) トリトン X-100 /100がインルメシトメントメントメント バイオラが社製) フを添加し、更に、上記と同様 (に破砕してフォティナス・ビラリス尾部破砕料象台音溶液

を得た。 【0025】このようにして得た溶液5mlをカップ型ブ レンダー(日本精機製作所社製)に入れ、5,000r.p.m. で 5分間処理したものに、12m1のグアニジンイソチオシア ネート溶液(6 Mグアニジンイソチオシアネート/37.5 mMクエン酸ナトリウム (p H7.0)/0.75%(W/V) N-ラ ウロイルザルコシンナトリウム/0.15M β-メルカプト エタノール)を添加する。この溶液をさらに上記プレン ダーを用い3,000r.p.m. で10分間処理し、3重のガーゼ を用いて沪渦して沪液を得た、次に、超遠心分離機用チ ューブ (日立工機社製) 4本に、予め1.2mlの5.7 Mの 塩化セシウム溶液を夫々重層し、その上に、上記沪液を 重層するように夫々分注し、超遠心分離機(日立工機社 製、SCP55H)を用いて温度15℃、30,000r.p.m.で16 時間遠心分離して沈澱物を得た。得られた沈澱物を、冷 70%(V/V) エタノールを用いて洗浄し、10mMトリス緩衝 液「10mMトリスー塩酸緩衝液(pH7.4)/5mMEDTA/ 1%ドデシル硫酸ナトリウム〕4mlに懸濁したものに、

同量の nーブタノール及びクロロフォルムを4対1 (容量比) 混液を添加して抽出し、常法により3,000r.p.m.
で10分間速と分離し、木屋及び有機溶媒層で分離した。この有機溶媒層で上記10mMトリス緩衝液4回を添加し、上記抽出及び分離操作を存むう操作を2回線り返した。 役与れた水配、1/10量の3 m都積射トリリス(145.2) 及び2倍量の冷エタノールを添加したものを温度-20°Cで2時間放置したのち、常法により8,000r.p.m.で20分面迄ら外に不足が表現させた。得られたR NAを4回の水に溶解し、上記エタノール沈震操件を行なった。得られたR NAをきるに1回の水に溶解し、3,75mgのR NAを超り

【0026】そして、以上の操作を再度繰り返すことにより合計で減少RNAを測度した。このRNA中よりmRNAを選択するために、アルののRNAを、オリゴ(dT)ーセルロース(ニューイングランドバイオラボ社製)カラムクロマトグラムにかけた。このカラムクロマトグラムにがいて、カラムとして、5回ドアセシリンジ(デルモ社製)を用いた。このカラムに、機能0.5gを沿出機断液(10mMトリスー場能機断液(plm NF、アル硫酸ナトリウム)で数割させたのも充填し、結合緩衝液(10mMトリスー場酸(pH 7.6)/1mHE DTA、34 NaCI/0.1%ドデシル硫酸ナトリカン。で平衡化して高製した。

【0027】7msのRNAに、同量の級動液(10m/N) スー塩酸の日7.6// 1mHE D TA/0.8 N kocl/0.1 % ドデシル確能ナトリウム)を添加し、温度6つで10分間 加熱処理し、米中で急冷した。これを前記調製したオリ ゴ(石丁) ーセルロースカラムにかけ、結合機能を使聞 を洗浄し、未結合のrーRNA及びセーRNAを完全に 洗浄し、更に、溶出緩動液でmーRNAを溶出してmー RNA40/nsを待た。

#### 2. ルシフェラーゼm-RNAの濃縮

次に、ショ糖密度勾配達心分離法によりルシフェラーゼ m-RNAを濃縮した。

【0028】10~25%(WY) のショ糖密度の配は、ベックマン社製のローターSW41用ボリアロマチェーブに40%(WY) ショ糖液 (50mH) リスー塩能緩衝液(p47.5)/20mWaCl / 1 mHE DT A / 40%(WY) ショ糖剤 0.5 mlを入れ、その上に2.4 ml ずつ25%(WY)、ショ株剤 0.5 mlを入れ、その上に2.4 ml ずつ25%(WY)、20%(WY)、20%(WY)、60%(WY) みじまり、15 ml が25%(WY)、20%(WY)

【0029】次に、m-RNAにコードされている蛋白質を調べることにより、ルシフェラーゼのm-RNAが 濃縮されている画分の同定を行なった。分画したRNA 1 µL 、ウサギ網状赤血球ライセート(アマシャム社 製 9 µL 及び (\*\*\* S) メチオニン1 µL (アマシャム社製) を混合し、30でで30分間反応させた。これに 150 µL のNE T機構液(150m %aC/ 5 ml E D T A (0.02% (¼/V)&d, /20ml りノー塩配機構液(中日・4) グーの5% (¼/V) /ニデットトー40(ベセスダリサーチラボ ラトリー社製、界面活性剤)〕を添加し、更に、1 µL レ が成シファーゼ曲符(後述のようにして測した もの。)を添加し、4 ℃で18時間放置した。これに10ms のプロティンAセファロース(ファルマシア社製)を添 加し、温度20で30分間放置したものを、常法に5 c 5 2,000r.p.n.で1分間途に分離処理し、樹脂を回収し

【0030】回収した樹脂を200点しのNET緩衝液で3回流浄し、次いで、400儿の5DS-PAGE用ナンフル横断液(6.5 Mirly Ja-dai酸解電液(h1) 10%(V/V) グリセロール/2%(W/V) ドデシル硫酸ナトリウム/5%(V/V) メルカアトエタノール/0.0%(W/V) ブロムフェノールグルー)を添加し、温度100℃で3分間蒸沸し、常法により12,000で.p.m.で1分間遠心分離沙理した。この遠心分離処理と符合れた上清を回収し、金屋を7.5%(W/V) ドデシル硫酸ナトリウム・ボリアクリルアミドゲルに乗せてラエムリ(Laemil) の方法(「ネーチュアー」(Nature)、第227頁、第680頁(1970) マゲル電気が練わずつか。

【0031】ゲル電気泳動を行なった後のゲルを10%(V/V)の耐酸に30分間浸漉し、蛋白質と固定したのち、水に30分間浸漉し、更に、1 Nサリナル酸ナトリウム溶液に30分間浸漉し、乾燥して乾燥ゲルを得、次いてX綾フィルム (7ジ写真フィルム社製、RX)を用いてフルオログラフィーを行なった。以上の機作にり、ルシフェラーゼm-RNAの存在する動分のFNAを用いた場合にのみ、ルシフェラーゼm-RNAの濃縮されている画がが同じできた。

#### 3. 抗ルシフェラーゼ血清の調製

精製ルシフェラーゼに対するウサギの抗ルシフェラーゼ 血清は、以下の方法により調製した。

【0032】3.2mg/ml濃度のルシフェラーゼ溶液(シ ブマ社験ルシフェラーゼを0.5 Mプリシルグリシン溶液 (向日:8)に溶解したもの10・7・10と、等量のフロイント (Freund)完全アシェバントで懸濁したもの2.2mgを、抗 原として体重2kgの日本中巨離ウサギの指字部に投与し 青音を向や見歩り、興年、胸育1週間接過したのち、同 様の指作を行ない、更に、胸育1週間接過したのち。同 様の指作を行ない、更に、飼育1週間接金採血を行なっ 様の指作を行ない、更に、飼育1週間接金採血を行なっ

【0033】そして、得られた血液を、温度4℃で18時間放置したものを、常法により3,000r.p.m. で15分間遠心分離し、上清として抗ルシフェラーゼ血清を得た。

4. c-DNAの合成

c - DNAの合成は、アマシャム社製キットを用いて行った。上述の如くして得られたm - RNA 2 μg を用いてアマシャム社の指示する「モル・セル・バイオル」(Mol. Cell Biol.)、第2巻、第161頁(1982)及び「ジーン」(Gene)、第25巻、第263頁(1983)記載の方法に従い処理して。300mの2 2 本語で - DNA を得た。

【00.34】にのc - DNA 150ugを $T_{AL}$  のTE機 前液(10umトリス-塩酸緩衝液(10H・1) 1 mWE DT A】に溶解上たものに、11ル L の混液((280um カコジル酸ナトリウム(1Hも 8) / (6um トリス-塩酸緩衝液(1Hも 8) / (2um 1Um 1H 1Um 1Um

【0035] この反応停止液に添成し、の水酸和フェールを用いて除蛋白処理を行なった。回収した水町に、 を多成し、の4 M静酸アンモニウム及び 100以し、の冷エ タノールを失々添加し、一70℃で15分間放置し、12,000 r.p.m.で10分間途心分離して。一DNAを開収した。こ なを10以し、のTE緩衝液に消解し、c - DNA溶解液 を得た。

【0036】以上の如くしてデオキシシチジンのテイル が付いたc-DNA100ngを得た。

5. ベクターに使用する組み換え体プラスミド pMCE 10DNAの調製

大腸菌W3110株(ATCC 27325)、プラスミド pBR325(B RL社製) 及びプラスミド pBR322 DNA(宝酒造社 製)を用いてティー・マスダ等 (T.Masuda et.al.)「ア グリカルチュラル・バイオロジカル ケミストリー」(Ag ricultural Biological Chemistry)、第50巻、第271~ 279頁 (1986) 記載の方法により作製したプラスミド p KN305 DNA並びにプラスミド pMC1403-3DNA (特開昭61-274683 号公報記載)を作製した。夫々のプ ラスミド1μg を、10μL の混液 [50mMトリスー塩酸 緩衝液(pH7.5)/10mM MgCl<sub>2</sub>/100mM NaCl/1 mMジチオ スレイトール〕に添加し、更に、これに、HindIII及びS all (いずれも宝酒浩計製)を夫々2ユニットずつ添加 し、37℃で1時間反応させて切断処理し、常法によるフ ェノール抽出及びエタノール沈澱処理を行ない沈澱物を 得た。この沈澱物を、10μL のライゲーション緩衝液 「20mM MgCl。/66mMトリスー塩酸緩衝液(pH7.6)/1mM ATP/15mMジチオスレイトール]に溶解し、この溶液 にさらに1ユニットのT4DNAリガーゼ(宝酒造社 製)を添加し、20℃で4時間連結反応を行なった。次い で、この反応液を用い、「ジェイ・バクテリオロジー

(J.Bacteriology、第119巻、第1072頁~第107頁 (1974年) 1 記載の形質転換法により、大期値 J M 101 (ATCC 33876)株を形質転換上、薬剤耐性 (アンビシリン剤性及 びテトラサイクリン感受性) 及びターガラクトシグーゼ さ忙を検討し、形質転換株と得た。この粉が質転換株に含まれる組み換え株プラスミド pMC E10 DN A を含する大開館 J M101 株を トリブトン19 (M/V) からなる 培地 1 L に、該約地を用い37でで16~24時間前時費 L 37Cで 3時間振過培養したのち、0.28のクロラムフェニコールを添加し、更に同一温度で20時間同時発をし、37Cで 3時間振過培養したのち、0.28のクロラムフェニコールを添加し、更に同一温度で20時間同時発をでい、路楽後を得た。

【0037】 次いで、この培養液を、常法により6,000 下,p.m. で10分間途心分離して湿潤菌体2gを得た。これを20mlの25% (WV)シ 動整含有する350mlトリスー 塩酸緩衝液(中18.0)に懸濁したのち、更に、これに、リ ゲース10mg、0.25M E DT 不溶液(中18.0) 8 ml 及び20 ※(M/V)ドデシル硫酸ナトリウム溶液 8 ml を大く流し し、60℃で3分間保温して溶離し、溶樹液を得た。

【0038】この溶菌液に、5M NaCl溶液13mlを添加 し、温度4℃で16時間処理したものを常法により15,000 r.p.m.で30分間遠心分離して抽出液を得、常法によりフ ェノール抽出処理及びエタノール沈濃処理を行ない沈濃 物を得た。次いで、この沈澱物を通常の減圧乾燥処理し た後、1 mMEDTAを含有する10mMトリスー塩酸緩衝液 6 ml (pH7.5) に溶解し、更に、これに、塩化セシウム6 g及びエチジウムプロマイド溶液(10mg/ml) 0, 2mlを添 加した。これを超遠心分離機を用いて常法により39,000 r.p.m.で42時間平衡密度勾配遠心分離処理を行ない、組 み換え体プラスミド pMCE10DNA含有物を単離し た。次いで組み換え体プラスミド pMCE10DNA含有 物からn-ブタノールを使用してエチジウムブロマイド を除去したのち、1 mME DTAを含有する10mMトリスー 塩酸緩衝液(pH7.5)に対して透析を行ない純化した組み 換え体プラスミド pMCE10DNA500μg を得た。 6. ベクターDNAの調製

【0039】このDNAを、TE緩衝液10μL に溶か し、混液 (280mM カコジル酸ナトリウム(pH6.8)/60mM トリス-塩酸緩衝液(pH6.8)/2mM塩化コバルト〕15μ しを加えたのち、更に、ティリング湿液(項目4記載) (5mM dGTPを用いた) 5µL 及びターミナルトラ ンスフェラーゼ(宝酒造社製)5ユニットを添加し、37 \*Cで15分間反応させた。前記項目4記載のc-DNAテ ィリング反応と同様の後処理を行なうことにより組み換 え体プラスミド pMCE10DNAのAccIサイトにデオ キシグアノシンのテイルが付いたDNAを調製した。 【0040】一方、プラスミド pUC19DNAのPstI サイ6にデオキシグアノシンのテイルが付いたDNAの 調製も同時に行なった。プラスミド pUC19DNA (宝 酒造社製)30 μg を、350 μL のTE緩衝液に溶解し たものに、40μL のMed緩衝液及び制限酵素PstI (室酒造社製)120ユニットを夫々添加し、37°Cで1時間 切断処理したのち 常法によりフェノールによる除蛋白 処理及びエタノール沈濤処理によりDNAを回収した。 【0041】得られたDNAを、35µL のTE緩衝液 に溶解したものに、50µL の混液〔280mM カコジル酸 ナトリウム(pH 6.8) /60mlトリス-塩酸緩衝液(pH6. 8)/1 mM塩化コバルト]、19μL の項目4記載のティ リング混液(dGTP含有) 並びに60ユニットのターミナ ルトランスフェラーゼ(宝酒造社製)を夫々添加し、37 ℃で10分間反応させたのち、常法によりフェノール処理 及びエタノール沈淵を行なうことによりDNAを回収し te.

#### 7. アニーリング及び形質転換

合成したc-DNA15ng及び上記の方法で得た二種のべ クターDNA 200ngを、35µL のアニール緩衝液〔10 mMトリスー塩酸緩衝液(pH7.5)/100 mM NaCl/1 mME DTA〕に溶解し、65℃で2分間、46℃で2時間、37℃ で1時間及び20°Cで18時間放置する操作によりc-DN AとベクターDNAをアニールした。

【0042】アニールしたDNAを用いて、ハナハン(H ana-han)の方法〔デイーエヌエイクローニング(DNA Cloning)、第1巻、第109~135頁(1985)〕により大腸 菌DH 1株(ATCC 33849)を形質転換し、プラスミド pU C19DNA及び組み換え体プラスミド pMCE10DNA をベクターとしたc-DNAバンクを夫々作製した。 8. ルシフェラーゼc-DNAの検索

組み換え体プラスミド pMCE10DNAのAccI部位 は、大腸南β-ガラクトシダーゼ遺伝子をコードする部 位にあるので、この部位に組み込まれたc-DNAはBガラクトシダーゼとの融合蛋白質を作った。また組み 換え体プラスミドpMCE10のB-ガラクトシダーゼ遺 伝子のプロモーターは前述した様に大腸菌トリプトファ ン遺伝子のプロモーターに変換してある。

【0043】組み換え体プラスミド pMCE10DNAを ベクターとするc-DNAバンクのコロニー96個をM9 カザミノ酸培地〔「モレキュラー・クローニング」(Mol ecular Cloning)、第440~441 頁 「コールド スプリ ング ハーバー ラボラトリー」(Cold Spring Harbor La boratory) (1982) 〕にチアミン (10μg/ml) を加えた培 地中、37℃で10時間振盪培養し、常法により集菌したの ち、前記項目2記載のSDS-PAGE用サンプル緩衝 液 200μL に懸濁し、100°Cで5分間煮沸した。 【0044】この懸濁液40以L を、7.5%(W/V) ポリ アクリルアミドゲルを用いて、常法により電気泳動を行 なった。泳動終了後、ゲルに展開した蛋白質を、ウエス タンプロット法〔「アナル・バイオケム」(Anal. Bioch m.)、第112 巻、第195 頁(1981)〕によりニトロセルロ ースのフィルターに転写し、このニトロセルロースフィ ルターをイミューンプロットアッセイキット (バイオラ ッド社製)を用いて抗ルシフェラーゼ血清で染色した。 この方法は、バイオラッド社の操作法に従った。 【0045】即ちニトロセルロースのフィルターを、ブ ロッキング溶液「TBS緩衝液「20mMトリスー塩酸緩衝 液/500mM NaC1(pH7.5)] に3%(W/V) のゼラチンを溶 かした溶液 100ml中 25℃で 30分間振盪した。次 に、このニトロセルロースフィルターを25m1の一次抗体 溶液 (ルシフェラーゼ抗血清を1%(W/V) のゼラチンを TBS緩衝液に溶かした溶液で25倍(V/V) に希釈した溶 液〕に移し、25℃で90分間振盪した。これを 100mlのツ ィーン(Tween) -20洗液「TBS緩衝液に0.05%(W/V) のツィーン(Tween) - 20を溶かした溶液〕中に移し、25 ℃で10分間振盪する操作を2回行なった。次いで、この ようにして得たニトロセルロースフィルターを60mlの三 次抗体溶液「西洋ワサビベルオキシダーゼで標識した抗 ウサギ抗体(バイオラッド社製) を1%(W/V) のゼラチ ンをTBS緩衝液に溶かした溶液で3000倍(V/V) に希釈 した溶液〕中に移し、25℃で60分間振盪したのち、 100 mlのツィーン(Tween) -20洗液でニトロセルロースフィ ルターを洗う上記操作を2回繰り返した。このようにし て得たニトロセルロースフィルターを、 120ml の発色液 〔60mgの4-クロロー1-ナフトールを20m1の冷メタノ

【0046】この様にして96個のコロニーを1グループ としたものの4グループについて、同様の方法を行なっ たところ、2つのグループでルシフェラーゼ抗血清で染 まる蛋白質バンドが認められた。次に、この2つのグル ープに属する96個のコロニーを12個のコロニーずつ8グ ループに分け同様の操作を行なったところ夫々1グルー プに抗ルシフェラーゼ血清と反応する蛋白質が認められ た、最後に、このグループに含まれる12個のコロニー を、1個のコロニーずつ同様の操作を行ないルシフェラ 一ゼ抗血清と反応する蛋白質を作るコロニーを同定し た。以上の操作によりルシフェラーゼc-DNAをもつ

ールに溶解した溶液及び60xL の30%(V/V) 過酸化水

素水を 100mlのTBS緩衝液に添加した溶液を混合した

溶液〕中に移し、25°Cで10分間発色させた。

2個のコロニーが得られた。この2個のコロニーより前 記項目5記載の方法でプラスミドDNAを測製した。得 られた組み換え体プラスミドDNAは、pALf2B8 及びPALf3A6と未々命名した。

9. 大きなルシフェラーゼ c - D N A の検索 - D N A の プローブの作製

組み換え体プラスミド pALf3A6DNA100 ugを、 330 μL のTE緩衝液に溶解し、これに40 μL のLow 緩衝液〔100mM トリスー塩酸緩衝液(pH7.5)/100mM M gCl<sub>2</sub> /10mMジチオスレイトール〕、130ユニットの Pst I(宝酒造社製)及び120ユニットのSacI (ベーリンガー マンハイム社製)を添加し、37℃で1.5時間切断した。 【0047】このDNA全量を0.7%(W/V) アガロース ゲルを用いた電気泳動により分離した。アガロースゲル 電気泳動はティー・マニアテス(T. Maniatis)等の方法 [「モレキ ラー・クローニング」(Molecular Cloning) 第156~161頁。「コールド・スプリング ハーバー ラボラトリー」(Cold Spring Habor Laboratory)(198) は従って行なった。ルシフェラーゼc-DNAを含 trDNAバンドを切り出し、透析チューブに入れ 2ml のTE緩衝液を加えたのち、透析チューブをシールし、 電気泳動により、ゲル中より緩衝液中にDNAを溶出し た。この溶液に等容量の水飽和フェノールを加え、攪拌 したのち、水層を回収し、常法に従いエタノール沈濃に よりDNAを同収した。

【0048】得られたDNAフラグメント10点を、125 は人のTE糖酸液に溶かし、Med緩衝液10点 D及びSau 3AI(筆面造社製)の ユニットを加え、37Cで2時間 反応させたのち、その全量を5%(k/W) ポリアクリルア ミドゲルを用いた電気減敏にかけて、DNA間片の介盤 を行なった。ポリアクリルアミドゲル電気減動は、エイ マクサム(A.Maxan)の方法(「メソズイン エンザイモ ロジェ」(極化的な前:EnzyanOcy)、第65巻、第66 頁(1 980)〕に従って行なった。1900中のDNAフラグメント を前述と同様の方法で作業社、1 1点の Sau 3 A1ルシ フェラーゼェーDNAフラグメントが得られたフェラーゼェーDNAフラグメント

【00.4.9】この1 μg のルシフェラーゼ c - DNA を、(α-8°P) dCTP (アマシャム社製) を用いて エックトランスレーション法定より構態した。ニックト ランスレーションは宝酒造社製のキットを用い、宝酒造 社の指示する [「ジェイ・モル・バイオル」(1.161.816 1.)、第113 巻、第237~251 頁 (1977) 〕及び [「モ レキュラー・クローニング」(Molecular Cloning)、第 109 ~112 頁、「コールド・スアリング・ハーバー・ラ ボラトリー」(Cold Spring Habor Laboratory)(1982)〕 記載の方法に能って行なった。

 大きなルシフェラーゼc-DNAの検索-コロニー ハイブリダイゼーション

前述の方法で調製した<sup>82</sup>Pで標識したルシフェラーゼc -DNA断片を、プローブとして用い、組み換え体プラ スミド pUC19DNAをベクターとするフォティナス・ ビラリス尾部と - DNAバクを、コロニーハイブリダ イビーション法に「独白管、核酸・酵素」、第26巻 575-579頁(1981) で検索し、ルシフェラーゼと- DN Aを有するコロニーを得た。そのうちの1個のコロニー の有する組み換え体アラスミドDNAを ALf 3と命名し、前記項目 5記載の方法でプラスミドDNAを割裂 した。該組み換え体プラスミドDNAを含有する大腸菌 を大腸菌DH1(pALf 3)と命名した。なお、該形質転 換大脂酸はATCCGf462として常託されている。

11. ルシオラ・クルシアタ(<u>Luciola</u> <u>cruciata</u>)のm -RNAの調製

生きたルシオラ・クルシアタ(ゲンジボタル・株式会社・西西百貨店より開入) 108を超低温冷凍庫に入れ、課 結し、はさみを用いて尾部を切り離し、得られて足る。 はこれる。 はこれる。 は、18mlのクアニジンイソチオシアネート溶液を添加 し、前定項目1 記載の方式に従って1.1 mgのRNAを誘 別した、このRNA1 mgや前項目1 記載の方式を ってオリゴ(dT) ーセルロースのカラムクロマトグラフ ィーを行ない30μg のルシオラ・クルシアタ尾部mーR NAをお贈りた。

12. ルシオラ・クルシアタ県館 - DNAバンクの作製 c - DNAの合成はアマシェム社より購入したキットを 用い、アマシェム社の指示する「モル・セル・バイオ ル」(Mol.Cell Biol.)、第2巻、第161 頁(1920)及び 「ジーン」(Gene)、第2巻、第263頁(1983)記載の方法 に促って合成した。

13. ルシオラ・クルシアタ由来のルシフェラーゼc-D

NAの検索

前記項目10で得られた組み換え体プラスミド pA L f 3 DNA10μg を、TE緩衝液90μL に溶解し、Med緩 衝液10μL 制限酵素EcoR125ユニット及び制限酵 素のClaI (いずれも宝酒造社製) 25ユニットを添加 し、37℃で2時間反応を行ないDNAを切断した。切断 した組み換え体プラスミド pALf 3DNAよりフォテ ナス・ビラリス (アメリカホタル) 由来のルシフェラー ゼc-DNA部分を含む 800bpのEcoRI/ClaIDNA フラグメントを、前記項目9記載のアガロースゲル電気 泳動法を用いる方法に従って単離し、 $1 \mu g$  のEcoRI/CIAIDNAフラグメントを得た。このDNA1 µg を、〔α-82P〕dCTP三燐酸(アマシャム社製)を 用いて前記項目9記載のニックトランスレーション法に より32 Pで標識した。32 Pで標識したEcoRI/ClaID NAフラグメントをプローブとして、ルシオラ・クルシ アタ尾部c-DNAバンクを項目10記載のコロニーハイ ブリダイゼーション法で検索することによりルシオラ・ クルシアタ由来のルシフェラーゼc-DNAを有する大 腸歯を選択した。その結果、ブローブとハイブリダイズ する大陽南コロニーを数個得た。この中の1コロニーの 有する組み換え体プラスミドDNAを pGLf 1と命名 し、前記項目5記載の方法に従い組み換え体プラスミド DNAを単離した。該組み換え体プラスミドDNAを含 有する大脳蘭を大脳蘭DH1(pGLf 1)と命名した。 なお、該形質転換株はATCC67482 として容託されて いる。

【0052】組み換え体プラスミドpGLf1DNAを担 pal、Hindll1、EcoRV、Dral、AfIl1、Hincl1 Pstl (いずれも宝酒産社製) 及Sspl (ニューイング ランドバイオラボ社製) を用い、単一消化及び二重消化 た、得られたDNA断片でブリースクが一窓気涂動法 により移動度パターン分析し、得られた移動度パターン と入フージDNA(宝酒産社製) を担応引託により消化 して 得られたDNA断片の毎度移動度パターンとを対 比した。その結果、得られた分子量は、2,000㎞であっ た。そして、上記ブラスミドの制限酵素地型は図2に示 す過りである。

 ルシオラ・クルシアタ由来のルシフェラーゼc - D NAの塩基配列の解析

 用いた単離(前記項目9記載の方法)、アラスミド pU C119 DNA及びルシフェラーゼ c - DNA断片の連結 pC応(前記項目5記載の方法)、連結反応液を用いた大 腸菌 J M101 株(ATCC 33876)の形質転換(補記項目5記載の方法)、並びに組み換え体アラスミド pG Lf 2 及び pG Lf 3 DNAの測製(前記項目5記載の方法)は、それぞれ前途の方法に従った。

【0053】次いで、組み換え体プラスミド pGLf 2 及び pGLf 3DNAを用いてキロシークエンス用欠失 キット(宝酒造社製)により、ヘニコフ(Henikoff)の方 法〔「ジーン」(Gene)、第28巻、第351 ~359 (1984)〕 に従いルシフェラーゼc-DNAに種々の欠失が導入さ れたプラスミドDNAを作製した。これらプラスミドD NAを前記項目5記載の方法で大腸菌JM 101株 (ATCC 3 3876) に導入した。このようにして得られた大腸菌にペ ルパーファージM13K O 7 (室酒造社製)を感染させ、 メッシング (Messing)の方法「「メソズ・イン・エンザ イモロジー (Methods in Enzymology) . 第101巻、第2 0~78頁(1983) ) に従って1本鎖DNAを調製した。 得られた 1 本緒 D N A によるシークエンシングは M13 シークエンシングキット (宝酒浩社製) を用いて上記メ ッシング(Messing) の方法に従い行なった。塩基配列の 解析のためのゲル電気泳動は8%(W/V) ポリアクリルア ミドゲル(富士写真フィルム社製)を用いて行なった。 【0054】得られたルシオラ・クルシアタ由来のルシ フェラーゼ c - D N A のみの全塩基配列を配列番号 1 に、また、当該c-DNAから翻訳されるボリペプチド のアミノ酸配列を配列番号2に夫々示した。 組み換え体プラスミド pGLf 37DNAの構築

15. 組み模な体アラスミド pG LT 37 DN Aの構築 大生、 N 米塩 15 9個のアミン酸をコードする塩基配列 を欠失し、ルシオラ・クルシアタ由来のルシフェラーゼ 遺伝子及びベクターD N A 全省有する D N A 断ち内 割割 について述べる。組み機と体アラスミド pG Lf 1 D N A 1 μg を、水9 0 μ Lに消除したものに、 Med暖衝液 10 μ L 及び Pst Lf (宝酒造計製) 20 ユニットを添加し、 アでで2時間消化する。 得られた消化物に、等量の水飽 和フェノールを添加し、常法による除蛋白処理及びエタ ノール沈濃処理を行った。 得られた沈製物を前記項目5 に記載の方法にて、ライゲーションし、次いで大腸菌 J M101 (A T C C 33876) へ影響成散を行った。

【0055】得られた形質転換体から前記項目ちに記載の方法によりDNAを単離した。これをSsp I、EcoR V及びPst I の制限酵素で単一又は二重消化して、もとの組み換え体プラスミド p G L f 1 に対して c ー D N A の向き方理 n きにでいる組み換え体プラスミド を選 援し、p G L f 10と命名した。組み換え体プラスミド を G L f 10 D N A 10 ル g を ・ 水90 ル L に溶解したものに、M ed緩耐液10 ル L 及び Ssp I、仁 ユーイングランドバイチラボ社製)10 ユニットを添加し、37℃で20分児埋し、密分分解物を得た。この部分分解物より前記項目り記載

の方法により、N末端より9個のアミン酸をコードする 塩基配列を欠失したルシフェラーゼ遺伝子及びベクター DNAの大部分を含有する4.0 Kb の<math>DNA断片 $2 \mu_S$ を単能した。

【0056】次に、このDNA断片1 μg を水95μ Lに 溶解したものに、1 Mトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) 5 μ L及びアルカリフォスファターゼ(宝酒造社製)0.3ユ ニット(1 µ L) を添加し、65℃で1時間処理し、常法 による除蛋白処理及びエタノール沈凝処理したのち、両 端を脱リン酸した4.0 Kb のDNA断片を1 μg 得た。 【0057】次に、大腸菌由来のトリア(trp) プロモー ターを含有するDNA断片の調製法について述べる。ト リププロモーターを含有するプラスミド pKN206 DN A[「アグリク・バイオル・ケム」(Agric.Biol.Che m.)、第50巻、第271 ~279 頁) (1986年) 記載のも の〕10μg を、水90μLに溶解し、Med緩衝液10μL及 びCla I (宝酒造社製) 20ユニットを添加し、37°Cで2 時間処理し、完全分解物を得た。これに前述のSsp I 10 ユニットを添加し、温度37°Cで30分間処理し、Ssp I に よる部分分解物を得た。これを常法による除蛋白処理及 びエタノール沈陽処理したのち、得られた沈澱を100 μ LのTE緩衝液に溶解し、前記項目9記載の方法によ り、トリププロモーターの大部分を含有する500bのDN A断片を単離した。

【0058】次に合成DNAの測製について述べる。上 2位4.0 Kb のDN A断片に含まれるルシフェラーゼ遺伝 子は、塩基症列より推定したところN末端より9個のア ミノ酸をコードする塩基配列を欠失している。また、上 近500mのDNA開片に含まれるトリプアロモーターは、 SDとATG間の塩基配列の一部を欠失している。そこ で、ルシフェラーゼのN末端より9個のアミノ酸をコー 下する塩基配列及びトリプアロモーターのSD ATG 間の塩基配列を補うために、以下の2種の合成DNA (配列番号3及び配列番号4)をベッグマン社製のシス テム17ラスDNA合成機を用いて会成した。

【0059】これらの2種の合成DNAをデェボン社製のネンソルブ・アルブ(NR)SOBB PBEP)を用いることにより、2018の 荷材製された合成DNAを夫々特た。これら2種の合成DNA1 188 を大々水45以上に溶解し、X106/Aイネーション級普液 [0.5Mトリス塩酸緩衝液(0月7.6)/0.1M Mgに1,50mがジチオスレイトール/10mMAT P15以上を添加し、更に、T4ボリヌクレオチドカイネース (宝流電社製) 102ニット(1月以1)を添加したのち温度分でて1時間処理した。これを常法による除蛋白処理及びエタノール心混処理を行い、5 不端をリン酸化上た会扱のDAをそれを表し、12 まずの得た

【0060】次に、ライゲーション反応により目的のプラスミドDNAの取得を行った。上記の限りン酸化した N末端より9個のアミノ酸をコードする塩基配別を欠失 したルシフェラーゼ遺伝子、ベクターDNAを含む4.0 Kb のDNA断片1μg、上記のトリププロモーターを 含む 500bのDNA断片1 μg 及び上記2種のリン酸化 した合成DNA0.1 $\mu$ g を夫々8 $\mu$ Lの水に溶解した。 これにX10ライゲーション緩衝液 [200mM MgCl<sub>2</sub>/660mM トリス塩酸緩衝液(pH7.6)/10mMATP/150mM ジチオ スレイトール ]  $1 \mu$ Lの及びT4DNAライゲース (宝 酒造社製) 1 ユニット (1 μ L) を添加し、温度16℃に て16時間反応を行った。得られた反応液を用いて前記項 目5に記載の方法にて大腸菌JM101(ATCC33876)へ 形質転換を行い、得られた形質転換体より、前記項目5 に記載の方法にてプラスミドDNAを単離し、Ssp I、 EcoRV及びPstIの制限酵素で単一又は二重消化し た。これを、0.7%アガロースゲル電気泳動にて展開 し、トリブプロモーターによりルシフェラーゼ遺伝子を 完全にコードするルシフェラーゼ遺伝子を発現するプラ スミドを得、該組み換え体プラスミドを、 pGLf 37と 命名した。また、該プラスミドを含有する大腸菌は大腸 南JM101 (pGLf 37)と命名した。

16. 組み換え体プラスミド pGLf 37DNAの変異 組み換え体プラスミド pGLf 37DNA30ug を、ヒド ロキシルアミン溶液「0.8M 塩酸ヒドロキシルアミン/ 0.1M リン酸緩衝液(pH6.0)/1mM EDTA]100μLに 溶解し、65℃で2時間変異処理したのち、常法によりエ タノール沈澱を行い沈澱物を回収した。この沈澱物をT E緩衝液 [10mMトリスー塩酸緩衝液(pH7.5)/1mM ED TA]に溶解し、ハナハン(Hana-han)の方法[ディー エヌエイ・クローニング (DNA Cloning)、第1巻、 第109~135頁(1985) 1 により、大陽南JM 101株(ATCC 33 876)を形質転換し、LB-anp寒天培地〔バクトトリプト ン1%(W/V)、酵母エキス0.5%(W/V)、NaCl 0.5%(W/ V), アンピシリン(50µg/ml)及び1.4%(W/V)寒天]に 接種し、37°Cで培養した。12時間後、出現してきたコロ ニーをLB-amp培地「バクトトリプトン1%(W/V)、酵母 エキス0.5%(W/V), NaCl 0.5%(W/V), 及びアンビシリン (50 µg/ml)〕 3 ml中、37℃で18時間振盪培養を行っ た。この培養液 0.5mlを10mlの上記LB-amp培地に接種 し、37°Cで4時間振盪培養したのち、8000r.p.m で10分 間の遠心分離操作により湿潤菌体を夫々20mgずつ得た。 【0061】回収した薬体を、0.1M KHoPO。(pH7.8)。 2mMEDTA、1mMジテオスレイトール、及び 0,2mg/ mlプロタミン硫酸からなる緩衝液 0.9mlに懸濁し 更 に、これに、10mg/mlのリゾチーム溶液100 a L を添加 し、氷中に15分間放置した。次に、この懸濁液を、メタ ノール、ドライアイス浴中で凍結し、次いで温度25℃に 放置し、完全に解凍した。更に、12000r.p.m. で5分間 遠心分離操作を行うことにより、上清として粗酵素1回

【0062】このようにして得られたルシフェラーゼを 含む相酵素液を50°Cで10分間熱処理し、その中の10μ1 について、特開平1-141592号公報記載の方法で力価の測 定を行った。その結果野生型ゲンジボタルルシフェラー はより無效定性に優れているものを得た。更に、この租 酵素液を物剛平1-141592号火線記載の方法で特製し、上記の方法で熱処理し、方面を測定した結果、野生型の精製ルシフェラーゼより熱安定性に優れていることが判明した。以上の如くして得られた耐熱性ルシフェラーゼをコードする遺伝子の組み込まれた組み換え体・プラスミド DNAを PGL 137 T ー M ー 2と命名し、該組み換え体・プラスミド DNAで形質管域含れた大腸値、すなわち大腸癌 (E. coll) JMO1(p GL 137 T ー M ー 2) は工業技術院設生物工業技術研究所に能工研条常第3452号 (FE BW Br-3452) として寄託されている。

【0063】なお、このようにして得られた変異型ホタルルシフェラーゼは野生型ホタルルシフェラーゼのアミ 力能配列において217 位のスレオコンがイソロイシンに 置換されている。特製した本酵素100キロカウント(Kco urt)含青する酵素流100 μ1 【10%能和販徳アンモニウ ム、0.2ml エチレンジアミン4 酢酸2ナトリウム及び0. 2 % (ω/切)アルブミンを含有する10mlリン酸緩衝流( p 日 7.6) ) を温度50℃でも分間保持して残存する酵素活 性を測定した。その結果本酵素は上記条件で65%の残存 酵素活性を保持していた。

【0064】なお、対照として野生型ホタルルシフェラ ーゼについても上記と同様にして残存酵素活性を測定し たところ活性は確認できなかった。

#### 17. 部位特異的変換

次にゲンジボタルルシフェラーゼの217番目のスレオニンを疎水性のアミノ酸であるバリン及びロイシンに変換させる方法を記載する。

【0065】組み換え体プラスミドpGLf37DNA10μg を制限酵素EcoRI, PstI (いずれも宝酒造社製)で二重 消化し、ルシフェラーゼc-DNAを含む2.1kbDNA 断片2.5μgを得た。このDNA断片をプラスミドpUC119 DNA(室酒造社製)にサブクローンし、得られたプ ラスミドDNAをpGPM-1と命名した。次いで組み換え体 プラスミドpGPM-1を項目5記載の方法で大腸菌JM101(AT CC33876) に導入した。このようにして得られた大腸菌 にヘルパーファージM13K07(宝酒造社製)を感染させる ことにより、メッシング (Messing) の方法 [メソズ イン エンザイモロジー (Methods in Enzymology). 第101巻、第20~78項(1983)]に従って1本鎖DNA を調製した、得られた1本額DNAによる部位特異的変 換は、インビトロ ミュータジェネシス システム バ ージョン2.0 (アマシャム社製)を用いて行った。な お、部位特異的変換のプライマーとして用いる為に、以 下の2種に合成DNAを項目15記載の方法で合成し た。すなわち、バリン用のプライマーとして配列番号5 に示す合成DNAを、ロイシン用のプライマーとして配 列番号6に示す合成DNAを部位特異的変異に供するプ ライマーとして夫々用いた。

【0066】また、部位特異的変換遺伝子のシークエン シングは、ダイプライマー タックシークェンシング キット (アプライド バイオシステムズ社製)を用いて 反応を行い、ABI373A DNAシーケンサー(アプライド バイオシステムズ社製)で泳動、解析を行った。この ようにして得られた部位特異的変換遺伝子は、野生型ホ タルルシフェラーゼの217番目のアミノ酸がバリン、ロ イシンに変換されているアミノ酸配列をコードしてお り、前者をpGPM-1-Val、後者をpGPM-1-Leuと命名した。 【0067】次に部位特異的遺伝子pGPM-1-Val DNA及 UpGPM-1-LeuDNA10μgを制限酵素EcoRI, PstI (い ずれも宝酒造社製)で二重消化し、ルシフェラーゼc-DNAを含む2.1kbDNA断片を、夫々2.5µgずつ得 た。これらのDNA断片を夫々組み換え体プラスミドpG Lf37DNAを制限酵素EcoRI、PstI(いずれも宝酒造社 製)で二重消化して得たルシフェラーゼc-DNAを含 まないベクター部分にクローニングして得られたプラス ミドDNAをpGLf37-217Val,pGLf37-217Leuと命名し た。

【0068】次いで、組み換え体プラスミドpGLf37-217 Val 及びpGLf37-217Leu を項目5記載の方法で大腸菌JM 101株 (ATCC 33876) に導入し、大腸菌 (E. coli) JM10 1 (pGLf37-217Va1)及び大腸菌 (E. coli) JM101 (pGLf 37-217Leu)を得た。なお、これらの形質転換体のう ち、大腸菌(E, coli) JM101 (pGLf37-217Val)は、微 工研条寄第3647号 (FERM BP-3647) として、大陽南 (E. coli) JM101 (pGLf37-217Leu) は微工研条寄第3648号 (FERM BP-3648) として、それぞれ工業技術院微生物工 業技術研究所に寄託されている。これらの形質転換体よ り項目16記載の方法により粗酵素液を得、更にこの粗酵 素液を特開平1-141592号公報記載の方法で精製した。こ のようにして得られた精製ルシフェラーゼを50°Cで60分 間熱処理し、その中の10 m L について特開平1-141592号 公報記載の方法で残存する酵素活性を測定したところ、 大腸菌 (E. coli) JM101 (pGLf37-217Val) 由来ルシフ ェラーゼは、65%残存酵素活性を保持し、また、大腸菌 (E. coli) JM101 (pGLf37-217Leu) 由来ルシフェラー ゼは、70%残存酵素活性を保持していた。

18. 組み換え体プラスミド pHLf TDNAの変異 次にヘイケボタル (ルシオラ・ラテラリス (Luciola, L ateralis) ) のルシフェラーゼの 217番目のアラニンを 疎水性のアミノ酸であるバリン、ロイシン及びイソロイ シンに変換させる方法を記載する。

【0069】特開平2-1718の分発記載の方法で改得した組み換え体プラスミド pHLf7を項目5記載の方法で 大鵝席別印(4070 33876)に導入した。なお、得られたルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼc-DNAのみの全盤基配列を起列番号7に、また、当該c-DNAから選定されるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号8に大々示した。このようにして得られた大鵝南より項目 17記載の方法で1本鎖DNAを調製した。得られた1本 鎖DNAによる部位特異的変換は、インビトロミュータ ジェネシスシステム バージョン-2.0 (アマシャム社 製)を用いて行なった。なお部位特異的変換のプライマ ーとして用いる為に、以下の3種の合成DNAを項目15 記載の方法で合成した。すなわち、バリン用のプライマ ーとして配列番号9に示す合成DNAを、ロイシン用プ ライマーとして配列番号10に示す合成DNAを、イソロ イシン用のプライマーとして配列番号11に示す合成DN Aを部位特異的変異に供するプライマーとして夫々用い た。また部位特異的変異遺伝子のシークエンシングは、 ダイプライマー タックシークエンシングキット (アプ ライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行ない、 ABI 373A DNAシークエンサー (アプライドバイオシ ステムズ社製)で泳動解析を行なった。このようにして 得られた組み換え体プラスミドにおけるルシフェラーゼ の部位特異的変換遺伝子は 野生型ヘイケボタルルシフ ェラーゼの 217番目のアミノ酸に相当する遺伝子部分が バリン、ロイシン、イソロイシンに変換されているアミ ノ酸をコードしており 夫々pHLf7-217Val pHLf7-217 Leu . pHLf7-217I1eと命名した。

【0070】次いで、組み線之体プラスミドPHLTで-2174。pHLTで-2174。pHLTで-2174。PLTで21716を項目 5記載の方法で大鵬選 JM101 (pHLTで-2174a1)、大鵬選 (E. coli) JM101 (pHLTで-2174a1)、大馬選 (E. coli) JM101 (pHLTで-2174a1)、大馬選 (E. coli) JM101 (pHLTで-21714e)、及び大鵬衛 (E. coli) JM100 (pHLTで語では、など、ため、ための影響・戦略のうち、大鵬選 (E. coli) JM101 (pHLTで-2174a1)は、敵工研条音第38399 (FERM BP-3839) として;大鵬遺 (E. coli) JM101 (pHLTで-2174a1)は、敵工研条音第3840号 (FERM BP-3840) として;大鵬遺 (E. coli) JM101 (pHLTで-2174a1)は、敵工研条音第3840号 (FERM BP-3840) として;大鵬遺 (E. coli) JM101 (pHLTで-2174a1)は、敵工研条音第3840号 (FERM BP-3840) として;大鵬遺 (E. coli) JM101 (pHLTで-2174a1)は、

7116)は、微工研究着第381号 (FBM P=3841)として、夫々工業技術院健生物工業技術研究所に善託されている。これらの形電整損体より項目16温報の方法により組修業液を特額を引入。このようにして得られた精製した。このようにして得られた構製した。このようにして得られた構製した。このようにして得られた構製としていて特闘率1-3279号公報記載の方法で発作する解系信任を測定したところ、すべて65%以上の残存活性を測定したところ、すべて65%以上の残存活性を関大している特別をはいる。

【0071】上記より明らかな如く本発明は、対照に比 し著しく耐熱性を有するルシフェラーゼであることが判 った。

#### [0072]

【発明の効果】本発明により耐熱性オタルルシフェラー ど遺伝子、で通信子を組み換え体りNA及び誘題み換 え体りNAを含む微生物により間熱性ホタルルシフェラー 一社を製造する方法並びにそのようにして得られた新製 な新製化オタルルシフェラーゼを観まされ、そして、 本発明の方法により、耐熱性ホタルルシフェラーゼを効 率よく生産することができるので、本発明は産業上極め て有耐である。

[0073]

【配列表】1.配列番号1

- (1) 配列の長さ: 1644
- (2)配列の型:核酸(3)鎖の数:一本鎖
- (4) トポロジー: 直鎖状
- (5) 配列の種類: cDNA to mRNA(6) 起源:ルシオラ・クルシアタ
- (7)配列:

ATG GAA AAC ATG GAA AAC GAT GAA AAT ATT GTA GTT GGA CCT AAA 45 COG TIT TAC CCT ATC GAA GAG GGA TCT GCT GGA ACA CAA TTA CGC 90 AAA TAC ATG GAG CGA TAT GCA AAA CTT GGC GCA ATT GCT TTT ACA 135 AAT GCA GTT ACT GGT GTT GAT TAT TCT TAC GCC GAA TAC TTG GAG 180 AAA TCA TGT TGT CTA GGA AAA GCT TTG CAA AAT TAT GGT TTG GTT 225 GTT GAT GGC AGA ATT GGG TTA TGC AGT GAA AAC TGT GAA GAA TTT 270 TIT ATT CCT GTA ATA GCC GGA CTG TTT ATA GGT GTA GGT GTT GCA 315 CCC ACT AAT GAG ATT TAC ACT TTA CGT GAA CTG GTT CAC AGT TTA 360 GGT ATC TCT AAA CCA ACA ATT GTA TIT AGT TCT AAA AAA GGC TTA 405 GAT AAA GTT ATA ACA GTA CAG AAA ACA GTA ACT ACT ATT AAA ACC. 450 ATT GTT ATA CTA GAT AGC AAA GTT GAT TAT CGA GGA TAT CAA TGT 495 CTG GAC ACC TTT ATA AAA AGA AAC ACT CCA CCA GGT TTT CAA GCA 540 TCC AGT TTC AAA ACT GTG GAA GTT GAC CGT AAA GAA CAA GTT GCT 585 CTT ATA ATG AAC TCT TOG GGT TCT ACC GGT TTG CCA AAA GGC GTA 630 CAA CTT ACT CAC GAA AAT ACA GTC ACT AGA TTT TCT CAT GCT AGA 675 GAT CCG ATT TAT GGT AAC CAA GTT TCA CCA GGC ACC GCT GTT TTA 720 ACT GTC GTT CCA TTC CAT CAT GGT TTT GGT ATG TTC ACT ACT CTA 765 GGG TAT TTA ATT TGT GGT TTT CGT GTT GTA ATG TTA ACA AAA TTC 810 GAT GAA GAA ACA TIT TIA AAA ACT CIA CAA GAT TAT AAA TGI ACA 855

AGT GTT ATT CTT GTA COG ACC TTG TTT GCA ATT CTC AAC AAA AGT 900 GAA TTA CTC AAT AAA TAC GAT TTG TCA AAT TTA GTT GAG ATT GCA 945 TCT GGC GGA GCA CCT TTA TCA AAA GAA GTT GGT GAA GCT GTT GCT 990 AGA CGC TIT AAT CIT CCC GGT GTT CGT CAA GGT TAT GGT TTA ACA 1035 GAA ACA ACA TCT GCC ATT ATT ATT ACA CCA GAA GGA GAC GAT AAA 1080 CCA GGA GCT TCT GGA AAA GTC GTG CCG TTG TTT AAA GCA AAA GTT 1125 ATT GAT CIT GAT ACC AAA AAA TCT TTA GGT CCT AAC AGA CGT GGA 1170 GAA GTT TGT GTT AAA GGA CCT ATG CTT ATG AAA GGT TAT GTA AAT 1215 ANT CCA GAA GCA ACA AAA GAA CTT ATT GAC GAA GAA GGT TGG CTG 1260 CAC ACC GGA GAT ATT GGA TAT TAT GAT GAA GAA AAA CAT TTC TTT 1305 ATT GTC GAT CGT TTG AAG TCT TTA ATC AAA TAC AAA GGA TAC CAA 1350 GTA CCA CCT GCC GAA TTA GAA TCC GTT CTT TTG CAA CAT CCA TCT 1395 ATC TIT GAT GCT GGT GTT GCC GGC GTT CCT GAT CCT GTA GCT GGC 1440 GAG CTT CCA GGA GCC GTT GTT GTA CTG GAA AGC GGA AAA AAT ATG 1485 ACC GAA AAA GAA GTA ATG GAT TAT GTT GCA AGT CAA GTT TCA AAT 1530 GCA AAA CGT TTA CGT GGT GGT GTT CGT TTT GTG GAT GAA GTA CCT 1575 AAA GGT CTT ACT GGA AAA ATT GAC GGC AGA GCA ATT AGA GAA ATC 1620 CTT AAG AAA CCA GTT GCT AAG ATG 1644

#### 2. 配列番号2

(1)配列の長さ:548(2)配列の型:アミノ酸

(3) トボロジー:直鎖状(4) 配列の種類:ペプチド

(5) 配列の起源:ルシオラ・クルシアタ

(6)配列:

```
Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu
Leu Gln His Pro Ser Ile Phe Asp Ala Gly
Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Val Ala Gly
Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Leu Glu
Ser Gly Lys Asn Met Thr Glu Lys Glu Val
Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asp
Ala Lys Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe
Val Asp Glu Val Pro Lvs Glv Leu Thr Glv
Lys Ile Asp Gly Arg Ala Ile Arg Glu Ile
```

- (1)配列の長さ:32
- (2) 配列の型 : 核酸 (3) 鎖の数 : 一本鎖
- (4) トポロジー: 直鎖状
- (5) 配列の種類:他の核酸 合成DNAプライマー

## Leu Lys Lys Pro Val Ala Lys Met

3. 配列番号3

(6)配列: CGA CAA TGG AAA ACA TGG AAA ACG ATG AAA AT (3) 鎖の数 : 一本鎖

4. 配列番号4 (1)配列の長さ:30

(2) 配列の型 : 核酸

- (4) トポロジー: 直鎖状 (5) 配列の種類:他の核酸 合成DNAプライマー
- (6)配列: ATT TTC ATC GTT TTC CAT GTT TTC CAT TGT

(3) 鎖の数: 一本鎖

(4) トポロジー: 直鎖状

(4) トポロジー: 直鎖状

- 5. 配列番号5
- (1)配列の長さ:38
- (2)配列の型 :核酸 (5) 配列の種類:他の核酸 合成DNAプライマー (6)配列: CTC TAG CAT GCG AAA ATC TAG TGA CTA CAT TIT CGT GA

6. 配列番号6 (3) 鎖の数 : 一本鎖

- (1) 配列の長さ:38
- (2)配列の型 :核酸
- (5) 配列の種類:他の核酸 合成DNAプライマー (6)配列: CTC TAG CAT GOG AAA ATC TAG TGA CGA CAT TIT CGT GA
- 7. 配列番号7
- (1)配列の長さ:1644 (2)配列の型:核酸
- (3) 鎖の数: 一本銷
- (4)トポロジー:直鎖状
- (5)配列の種類: cDNA to mRNA
- (6)配列の起源:ルシオラ・ラテラリス
- (7)配列:

TIT TCT CAC GCT AGA GAT CCA ATT TAT GGA AAC CAA GTT TCA CCA GGC ACG GCT ATT TTA ACT GTA GTA CCA TTC CAT CAT GGT TTT GGT ATG TTT ACT ACT TTA GGC TAT CTA ACT TGT GGT TTT CGT ATT GTC ATG TTA ACG AAA TTT GAC GAA GAG ACT TIT TIA AAA ACA CIG CAA GAT TAC AAA TGT TCA AGC GTT ATT CTT GTA CCG ACT TTG TTT GCA ATT CTT AAT AGA AGT GAA TTA CTC GAT AAA TAT GAT TTA TCA AAT TTA GTT GAA ATT GCA TCT GGC GGA GCA CCT TTA TCT AAA GAA ATT GGT GAA GCT GTT GCT AGA CGT TIT AAT TIA CCG GGT GTT CGT CAA GGC TAT GGT TTA ACA GAA ACA ACC TCT GCA ATT ATT ATC ACA CCG GAA GGC GAT GAT AAA CCA GGT GCT TCT GGC AAA GTT GTG CCA TTA TTT AAA GCA AAA GTT ATC GAT CTT GAT ACT 1170 AAA AAA ACT TTG GGC CCG AAC AGA CGT GGA GAA GTT TGT GTA AAG GGT CCT ATG CTT ATG AAA GGT TAT GTA GAT AAT CCA GAA GCA ACA AGA GAA ATC ATA GAT GAA GAA GGT TGG TTG 1290 CAC ACA GGA GAT ATT GGG TAT TAC GAT GAA GAA AAA CAT TIC TIT ATC CTC CAT CCT TIC AAG TCT TTA ATC AAA TAC AAA GGA TAT CAA

ATG GAA AAC ATG GAG AAC GAT GAA AAT ATT GTG TAT GGT CCT GAA CCA TTT TAC CCT ATT GAA GAG GGA TCT GCT GGA GCA CAA TTG CGC AAG TAT ATG GAT CGA TAT GCA AAA CTT GGA GCA ATT GCT TIT ACT AAC GCA CIT ACC GGT GTC GAT TAT ACG TAC GCC GAA TAC TTA GAA AAA TCA TGC TGT CTA GGA GAG GCT TTA AAG AAT TAT GGT TTG GTT GTT GAT GGA AGA ATT GCG TTA TGC AGT GAA AAC TGT GAA GAA TTC TTT ATT CCT GTA TTA GCC GGT TTA TTT ATA GGT GTC GGT GTG GCT CCA ACT AAT GAG ATT TAC ACT CTA CGT GAA TTG GTT CAC AGT TTA GGC ATC TCT AAG CCA ACA ATT GTA TTT AGT TCT AAA AAA GGA TTA GAT AAA GTT ATA ACT GTA CAA AAA ACG GTA ACT GCT ATT AAA ACC ATT GTT ATA TTG GAC AGC AAA GTG GAT TAT AGA GGT TAT CAA TOO ATG GAC AAC TIT ATT AAA AAA AAC ACT CCA CAA GGT TTC AAA GGA TCA AGT TTT AAA ACT GTA GAA GTT AAC CGC AAA GAA CAA GTT GCT CTT ATA ATG AAC TCT TCG GGT TCA ACC GGT TTG CCA AAA GGT GTG CAA CTT ACT CAT GAA AAT GCA GTC ACT AGA

GTA CCA CCT GCT GAA ITA GAA ICT GTT CTT

TIG CAA CAT CCA AAT ATT TIT GAT GCC GGC

GTT GCT GGC GTT CCA GAT CCT ATA CCT GAT

3-170

GAG CTT CCG GGA GCT GTT GTA CTT GAA

AAA GGA AAA TCT ATG ACT GAA AAA GAA GCA

ATG GAT TAC GTT GCT GAT CAA GTT ACA

GGG GAC GAA GGT GTT GTT GCT GGT GGT GCT CCT TTT

3-180

GGG GAC GAA GGT CCA AAA GGT CCC ACT GGT

AAA ATT GAC GGT AAA GGA ATT AGA GAA ATT

CTG AAG AAA CCA GTT GCT AAG ATG

- 8. 配列番号8
- (1)配列の長さ: 548
- (2)配列の型:アミノ酸
- (3)トポロジー:直鎖状
- (4)配列の種類:ペプチド
- (5)配列の起源:ルシオラ・ラテラリス
- (6)配列:

Met Glu Asn Met Glu Asn Asn Glu Asn Ile Val Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gin Leu Arg Lys Tyr Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu Thr Glv Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu Lys Ser Cys Cys Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile Ala Leu Cvs Ser Glu Asn Cvs Glu Glu Phe Phe Ile Pro Val Leu Ala Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile Tyr 7hr Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr Val Thr Ala Ile Lys Thr Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile 100 Lvs Lvs Asn Thr Pro Gin Glv Phe Lvs Glv Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Gln Leu Thr His Glu Asn Ala Val Thr Arg

Phe Ser His Ala Arg Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Glv Thr Ala Ile Leu Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe Asp Glu Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gin Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Asp Leu Ser Asp Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala Arg Arg Phe Asn Leu Pro Gly Val Arg Gin Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile Ile Thr Pro Giu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val Tie Asp Len Asp Thr Lys Lys Thr Leu Gly Pro Asu Arg Arg Gly Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met Lys Gly Tyr Val Asp Asp Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu Glu Gly Trp Leu His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln

Val Pro Pro Ala Giu Leu Giu Ser Val Leu

Leu Gin His Pro Asn 11e Phe Asp Ala Giy
Val Ala Giy Val Pro Asp Pro IIe Ala Giy

Cu

Giu Leu Pro Giy Ala Val Val Val Leu Ciu

Lys Giy Lys Ser Net Thr Giu Lys Giy Lau

Het Asp Tyr Val Ala Ser Gin Val Ser Asn

Ala Lys Arg Leu Arg Giy Giy Val Arg Phe

Val Asp Giu Val Pro Lys Giy Leu Thr Ciy

Lys 11e Asp Giy Lys Ala 11e Arg Giu IIe

Lys 11e Asp Giy Lys Ala 11e Arg Giu IIe

# Leu Lys Lys Pro Val Ala Lys Met

- 9. 配列番号9 (1) 配列の長さ:36
- (1) 配列の長さ:36
- (2) 配列の型 : 核酸
- (3)鎖の数:一本鎖(4)トポロジー:直鎖状
- (5) 配列の種類:他の核酸 合成DNAプライマー

- (6) 配 列 : AGC GTG AGA AAA ACG CGT GAC GAC ATT TTC ACG AGT
- 1 0 . 配列番号10
- (1) 配列の長さ:36
- (2)配列の型:核酸

- (3) 鎖の数 : 一本鎖
- (4) トポロジー: 直鎖状
- (5)配列の種類:他の核酸合成DNAプライマー

技術表示箇所

(6) 配 列 : AGC GTG AGA AAA ACG CGT GAC CAA ATT TTC ACG AGT

1 1. 配列番号11

(1) 配列の長さ:36

(3) 鎖の数: 一本鎖 (4) トポロジー:直鎖状

(2)配列の型 :核酸 (5) 配列の種類:他の核酸 合成DNAプライマー (6)配列:AGC GTG AGA AAA ACG CGT GAC GAT ATT TTC ACG AGT

【図面の簡単な説明】

【図2】組み換え体プラスミドpGLfDNAの制限酵 【図1】組み換え体プラスミドpALfDNAの制限酵 素による切断地図。

素による切断地図。

[図1] 【図2】 pALf3 pGLf1 EcoRI 4.7Kb pUC19 C-DNA - sUC19 C-DNA

フロントページの続き

識別記号 庁内整理番号 FI (51) Int. Cl. 5 C12R 1:19)